

マウス胎子肝臓の赤芽球島中心マクロファージと 類洞腔マクロファージの関連性について

—免疫組織化学ならびに電子顕微鏡による形態学的観察—

園田 祐治

胎生造血期の肝臓に分布するマクロファージと生後の肝常在性マクロファージであるクッパー細胞との関連を検討するため、胎子期から新生子期のマウス肝臓を用い、ラット抗マウスマクロファージモノクローナル抗体 F4/80免疫染色と鉄染色による顕微鏡観察ならびに電子顕微鏡観察を行い比較した。肝臓単位面積あたりの F4/80陽性細胞数は肝臓形成初期から生後早期まで急速に増加するが、生後4日と生後13日との間で有意に減少した。F4/80陽性細胞は胎生11日からすでに肝臓内に少数存在し、原始類洞腔でスカベンジャーマクロファージとして大小様々な細胞断片を取り込み、細胞質には鉄陽性封入体が認められた。肝臓造血最盛期に F4/80陽性細胞は造血巣内の赤芽球島中心マクロファージとなり、赤芽球からの放出核をはじめとして大小の封入体を含み、多数の鉄陽性封入体を含有した。造血退縮期の胎生19日で、F4/80陽性細胞は造血巣内に存在するほか、造血細胞と離れ肝細胞間に孤立性に分布した。孤立性の F4/80陽性細胞の多くは鉄反応陽性を示したが、ほかに鉄陰性で小型球形の単核細胞が認められた。生後早期に肝細胞間に孤立性に分布する小型の F4/80陽性細胞は鉄反応陰性であり、高い核-細胞質比を示した。生後13日の肝臓で、F4/80陽性細胞は造血系細胞とは離れ、生後のクッパー細胞と同様に類洞壁に限局し、鉄陽性封入体を含まなかった。新生子期の肝臓には、アポトーシスならびに dark cell formation の過程を経て細胞死にいたる大型マクロファージが認められた。新生子期は肝造血の退縮に伴って肝臓マクロファージにも著しい変化がみられる特異的な期間であり、卵黄嚢に由来する胎生マクロファージの少なくとも一部は新生子期の肝臓内で細胞死に陥り消失すると推察された。生後早期の肝臓内に出現する鉄反応陰性の小型単核細胞が、類洞腔に常在するマクロファージの前駆細胞と考えられた。

(平成15年9月19日受理)

A Morphological and Immunohistochemical Study on the Relationship between Central Macrophages of Erythroblastic Islands and Sinusoidal Macrophages in the Mouse Fetal and Neonatal Liver

Yuji SONODA

To clarify the relationship between fetal macrophages in hematopoietic liver and resident macrophages, Kupffer cells, in the sinusoids of postnatal livers, an immunohistochemical study with rat anti-mouse macrophage monoclonal antibody F4/80 and histochemical staining for iron as well

川崎医科大学 解剖学
〒701-0192 倉敷市松島577
E-mail address : ysonoda@med.kawasaki-m.ac.jp

Department of Anatomy, Kawasaki Medical School : 577
Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-0192 Japan

as electron microscopic observations were carried out. There was a rapid increase in the number of F4/80-positive cells per unit area (1 mm^2) from 11 days of gestation, but then there was a significant decrease between 4 and 13 days after birth ($p < 0.01$). At 11 days of gestation, liver anlagen contained a few F4/80-positive cells in primitive sinusoidal lumina. The macrophages showed active phagocytosis as scavengers, and contained Fe-positive phagosomes. In the livers at 13 days of gestation, F4/80-positive cells were identified among hepatic cell cords as central macrophages of erythroblastic islands in the hematopoietic foci. The central macrophages contained phagosomes derived from extruded nuclei of definitive erythroblasts and Fe-positive inclusions. At 19 days of gestation, F4/80-positive cells were observed in hematopoietic foci, and a few F4/80-positive cells without hematopoietic cells also appeared among hepatocytes. Although the majority of F4/80-positive cells among hepatocytes contained Fe-positive inclusions, a few small F4/80-positive but Fe-negative mononuclear cells also appeared. A few large macrophages underwent cell death not only through classical apoptosis but also through a process called "dark cell formation." At 13 days of age, F4/80-positive reactions were identified only in sinusoidal macrophages, and F4/80-positive cells were Fe-negative. Some of primitive macrophages derived from the yolk sac underwent cell death and disappeared from the liver shortly after birth. The small F4/80-positive but Fe-negative mononuclear cells in early postnatal livers could be considered as a candidate for a precursor of hepatic resident macrophages of Kupffer cells.

(Accepted on September 19, 2003) *Kawasaki Igakkaishi* 29(2): 145-159, 2003

Key Words ① Kupffer cell ② F4/80 ③ Fe ④ Fetal liver hematopoiesis
⑤ Mouse

はじめに

肝臓は胎生期の造血器官から生後の消化腺へと、その機能を大きく変える特異な臓器である。胎生肝臓造血は卵黄囊造血に引き続き、卵黄囊や aorta gonad mesonephros (AGM) 領域などに起源を持つ造血幹細胞の遊走と定着によって始まり^{1), 2)}、肝芽細胞や造血巣内に位置する赤芽球島中心マクロファージによって形成される造血微細環境下で、はじめは主として赤血球と巨核球、ついで顆粒球が生成される。マクロファージは肝臓造血の開始当初より卵黄囊由来の原始赤血球や肝細胞間で成熟した赤芽球からの放出核を活発に取り込み、肝臓造血上欠くことのできない細胞の一つである³⁾。一方、造血が消失した後の生後の肝臓には肝臓常在性マクロファージとしてクッパー細胞が存在する。クッパー細胞は最大の組織在住マクロファージ集団であり、

血流によって肝臓類洞に運ばれる様々な物質をスカベンジャー細胞として活発に取り込み、分解処理する⁴⁾。クッパー細胞は単核性食細胞系(MPS)に含まれ、骨髓造血に由来する単芽球から前単球を経て単球に分化し、肝臓へ遊出した後、生存期間数日～2週間程度の短命で分裂能をもたないクッパー細胞へ分化するといわれるが^{5)~7)}、胎生期肝臓にみられる赤芽球島中心マクロファージと生後の肝臓大食細胞であるクッパー細胞との関連については不明な点が少なくない。本研究は胎生期から生後早期の様々な段階の肝臓造血にみられるマクロファージの形態学的変化を、ラット抗マウスマクロファージモノクローナル抗体 F4/80 による免疫染色と鉄染色による顕微鏡観察ならびに超微形態観察を合わせ行うことにより検討し、胎生肝臓造血期のマクロファージと生後のクッパー細胞との関連を形態学的に明らかにすることを目的とする。

材料と方法

動物は日本クレアラボラトリー (Tokyo, Japan) より購入した ICR マウスで、胎生11, 13, 14, 19日の胎子ならびに生後1, 2, 4, 7, 9, 13, 15日の新生子各々5匹の総計55匹を用いた。恒温条件下 ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) で固形飼料 (NMF, オリエンタル酵母社製) と自由飲水で飼育した成熟雌性マウスを一晩雄性マウスと交配し、翌日を妊娠0日とした。妊娠マウスは所定の齢期で、クロロホルムにて深麻酔した後開腹し、子宮より実体顕微鏡下で胎子を取り出した。新生子は氷もしくはクロロホルムにて深麻酔した。胎子および新生子の肝臓を光学ならびに電子顕微鏡で観察した。

光顕観察

胎子より摘出した肝臓は重量測定後、4%パラホルムアルデヒド液 (0.1 M リン酸緩衝液, pH 7.4, 4°C) に浸漬し、4時間固定した。新生子ではクロロホルムにて深麻酔後、4%パラホルムアルデヒド液を心臓左心室より大動脈に灌流し、灌流固定開始後15~20分で肝臓を摘出した。摘出した肝臓はさらに2時間同固定液に浸漬した。固定後、肝臓を0.1 M リン酸緩衝液にて洗浄し、エタノール系列で脱水、パラフィンに包埋し、厚さ $4\ \mu\text{m}$ の連続切片を作成した。なお一部の新生子はクロロホルムで深麻酔後、開腹し肝臓摘出した後、重量を測定した。各齢期の肝臓は脱パラフィン後、マイヤーのヘマトキシリンで核染、エオシンにて染色した後、一部の組織切片については次のような組織化学的処理を行った。

1) F4/80抗体によるマクロファージの免疫染色

肝臓内におけるマクロファージを VECTASTAIN ABC Elite kit (Vector 社製, California) を用いたアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合法 (ABC 法) による免疫染色

で観察した。厚さ $4\ \mu\text{m}$ のパラフィン切片を内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止するため、0.3% H_2O_2 含有メタノールに30分浸漬した。ついで非特異的抗体反応を阻止するため、0.1% 正常ウサギ血清含有リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.6, 室温) に20分間浸漬した後、PBS で250倍に希釈したラット抗マウスマクロファージモノクローナル抗体 F4/80 (コスモバイオ社製, 東京) に 37°C で2時間反応させた。ついでビオチン標識二次抗体およびペルオキシダーゼ標識アビジン試薬で、それぞれ 37°C で30分間処理した後、0.005% H_2O_2 含有0.1% ジアミノベンチジン-50 mM トリス緩衝液 (pH 7.6) で発色させた。以上の免疫染色操作はすべて湿箱中で行った。なお陰性対照標本として、抗マクロファージモノクローナル抗体の代わりに、0.1% 正常ウサギ血清アルブミンで処理した標本を、同様の手順で染色した。

2) 鉄染色による非ヘモグロビン鉄

肝臓内における非ヘモグロビン鉄、すなわち Fe^{2+} : 第1鉄イオンと Fe^{3+} : 第2鉄イオンの肝臓内における局在を観察するため、マクロファージ免疫染色標本にさらにベルリンブルー法ならびにターンブルブルー法による鉄染色を行った。組織内に有機的に結合する非イオン化鉄 (仮面鉄) を遊離させるため、マクロファージ免疫染色後の組織切片を蒸留水で十分洗浄後、硫酸アルコール (0.4% 濃硫酸-90% アルコール) に2時間浸した。アルコールならびに蒸留水で十分洗浄した後、2% フェロシアン化カリウム-1% HCl 等量混合液で1時間処理し、 Fe^{3+} を青色のフェロシアン化鉄 ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3\text{Fe}_4$) として検出した (ベルリンブルー法)。ついで同組織切片を蒸留水で十分洗浄した後、2% フェリシアン化カリウム-1% HCl 等量混合液に1時間浸し、 Fe^{2+} を青色のフェリシアン化鉄 ($\text{Fe}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$) として検出した (ターンブルブルー法)。蒸留水にて十分洗浄した後、ヘマトキシリンにて核染し、光顕観察した。

3) F4/80陽性細胞数

胎生11, 13, 19日, 生後4日と13日の各齢期5例の肝臓パラフィンブロックより, F4/80陽性細胞の単位面積(1 mm²)あたりの細胞数を計測した. F4/80抗体による免疫染色を行った4 μm厚切片の肝葉中央部で8~10ヶ所を対物レンズ×20で無作為に顕微鏡写真撮影した. 最終倍率500倍に拡大した写真(600 μm × 465 μm)上で, F4/80陽性細胞を数え, 単位面積あたりの数を求めた. 各期5例の平均値と標準偏差を比較した.

電顕観察

胎子より摘出した肝臓をカルノフスキー液(4%パラホルムアルデヒド-5%グルタルアルデヒド-0.1 M カコジル酸緩衝液, pH 7.4, 4℃)に投入, 15分間固定後, 肝臓を約1 mm角に細切し, 同固定液にさらに3時間浸漬した. 新生子では2%グルタルアルデヒド液(0.1 M カコジル酸緩衝液, pH 7.4, 4℃)を心臓左心室より大動脈に灌流した. 肝臓を摘出後, 1 mm角に細切し1時間同上固定液に浸漬した. 組織ブロックを1%四酸化オスミウム液に2時間浸漬し, 0.1 M カコジル酸緩衝液で洗浄後, エタノール系列で脱水, プロピレンオキサイドで置換し, エボン812樹脂に包埋した. エボンブロックよりダイヤモンドナイフを用い, ライカウルトラカット S (Leica, AG., Wien, Austria)にて厚さ約90 nmの超薄切片を作成後, 単孔グリッドに載せ, 酢酸ウランならびにクエン酸鉛で電子染色し, 日本電子 JEM 2000 EXII 型電子顕微鏡にて80 kV または日立 H-7100型電子顕微鏡にて75 kVの加速電圧で観察した.

なお, 本研究は川崎医科大学動物実験委員会の承認(No. 02-61)を受け, 川崎医科大学動物実験指針に基づき行った.

成 績

胎生期と新生児期肝臓重量と F4/80陽性細胞の数

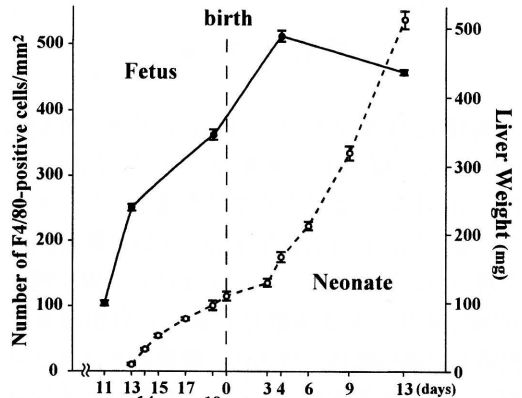


Fig. 1. Number of F4/80-positive cells in unit area(1 mm²) and liver weights.

Solid circles and lines (—●—) indicate F4/80-positive cells. Open circles and broken lines (---○---) indicate liver weights (Mean ± SD). Livers showed a rapid increase in weight until 13 days after birth. F4/80-positive cells, on the other hand, significantly decreased in number per unit area between 4 and 13 days after birth ($P < 0.01$).

Figure 1に胎生13日より生後13日までの肝臓重量を示した. この図にみるように胎生13日では11.7 ± 1.1 mgが胎生19日には96.3 ± 11.5 mgとなり, 胎生の6日間で約8倍に増加, 生後は重量増加率はやや減少したが, 生後13日で508 ± 23.2 mgとなり, 生後4日の約3倍の値を示した. 一方, F4/80陽性細胞の数を胎生期から生後早期で計測すると, 単位面積あたりのF4/80陽性細胞数は胎生11日で104 ± 6.9, 胎生13日で256 ± 8.4, 胎生19日で359 ± 15.5, さらに生後4日で514 ± 16.9となり, 肝臓形成期から生後早期までF4/80陽性細胞は肝臓重量と同様に急速に増加したが, 生後13日で451 ± 7.7となり, 生後4日に比べ, 有意な減少を示した ($P < 0.01$).

胎生期から生後早期の肝臓とマクロファージ

A. 胎生11日 (肝臓造血開始期)

胎生11日の肝臓は周囲を単層の中皮細胞で被われ, 広く拡張した洞様毛細血管である原始類洞と類洞に挟まれる原始肝細胞索が認められた. 原始類洞は肝原基内を複雑に迂曲して走行し,

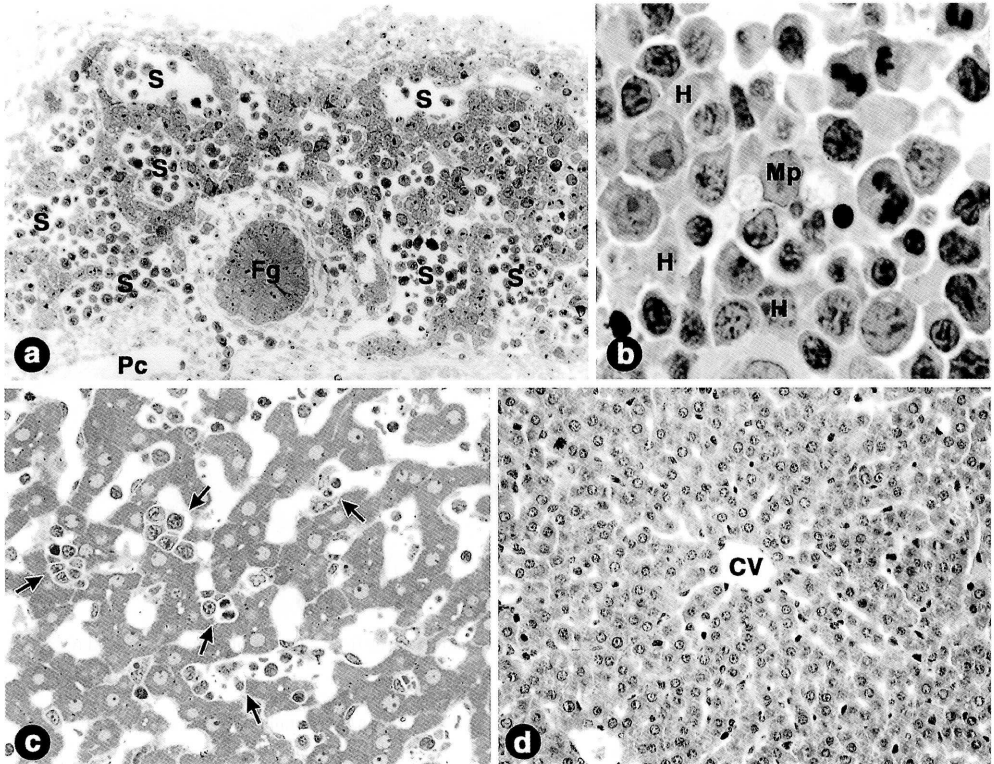


Fig. 2. Light micrographs of fetal and neonatal livers. 1 μ m sections stained by toluidine blue.

- a. An embryonic liver anlage at 11 days of gestation.
Sinusoidal lumina(S) are widely expanded. Fg : foregut. Pc : peritoneal cavity. $\times 180$.
- b. A hematopoietic liver at 13 days of gestation.
Numerous hematopoietic cells, mainly erythroids, gather and proliferate among hepatocytes(H), and a macrophage(Mp) is centrally located among hematopoietic cells. $\times 1,200$.
- c. A neonatal liver at four days of age.
Small solitary hematopoietic foci(arrows) are diffusely scattered on meandering sinusoids. Liver acinus formation is prominent, but liver lobules are still inconspicuous. $\times 300$.
- d. A liver at 13 days of age.
The liver lobule consists of hepatic cords and sinusoids radiating from central veins(CV), and hematopoietic cells are negligible in the lobule. $\times 200$.

類洞内皮下に肝芽細胞が配列した (Fig. 2a)。原始肝細胞索中には肝芽細胞または肝芽細胞と類洞内皮間に大型球形の造血細胞が1ないし数個集まり、径8~10 μ mの球状を呈する孤立性造血細胞集塊が認められた。肝芽細胞は造血細胞集塊を挟み、立方型や多角体状の細胞輪郭を呈し、核は径5~8 μ mの異染色質に乏しく明調で、複数の大型核小体を有した。細胞質には粗面小胞体や脂質滴が多数含まれ、隣接する肝芽細胞は短い細胞質突起で連結した。肝臓内のF4/80染色で陽性を呈するマクロファージは

類洞腔と類洞壁に限局し、原始肝細胞索内すなわち類洞内皮と肝芽細胞または肝芽細胞間には認められず、肝臓内の造血細胞と直接に接することはなかった。マクロファージは径0.1~3 μ mの封入体を2~3個含み、多くの封入体は鉄染色陽性反応を示した (Fig. 3a)。電顕レベルでマクロファージは直径9~12 μ mの球形または卵円形を呈する大型の細胞で、細胞表面には長く迂曲するフィラメント状の細胞質突起を多数有した。核は異染色質の凝集が少なく明調で、核膜の陥入があり、よく発達した核小体

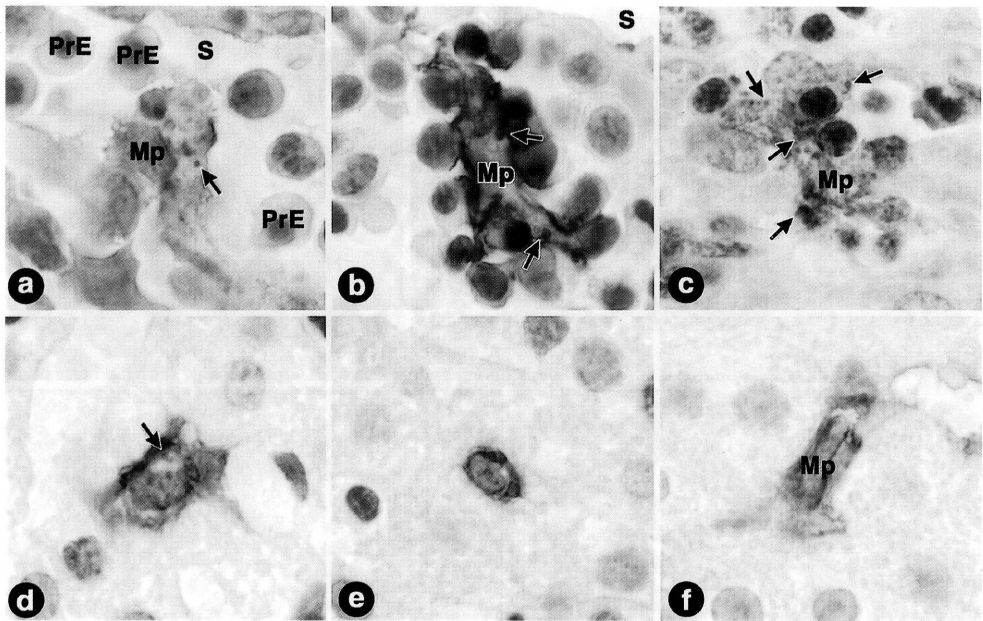


Fig. 3. Immunohistochemical F4/80 and histochemical iron stained liver from 11 days of gestation to 13 days after birth. Mp : macrophage. $\times 1,150$.

a. Eleven days of gestation.

An F4/80-positive macrophage in the primitive sinusoidal lumen (S) contains a blue Fe-positive granule (arrow). PrE : primitive erythrocyte.

b. Thirteen days of gestation.

A central macrophage of an erythroblastic island is strongly F4/80-positive and contains a few Fe-positive inclusions (arrows).

c. Nineteen days of gestation.

An F4/80-positive macrophage, surrounded by hematopoietic cells, contains numerous Fe-positive inclusions (arrows).

d. Four days after birth.

A large F4/80-positive cell contains an Fe-positive inclusion (arrow) but no hematopoietic cells are seen around it.

e. A small F4/80-positive cell in a four-day-old liver.

The nucleus is slightly indented and no Fe-positive inclusion is seen in the scanty cytoplasm.

f. An F4/80-positive macrophage at 13 days after birth.

Fe-positive inclusion cannot be detected in any macrophages (Mp).

を含んだ。マクロファージの細胞質は径0.1～3 μm の大小様々な封入体を含有した (Fig. 4a, b)。

B. 胎生13日 (肝臓造血最盛期)

胎生13日で F4/80陽性マクロファージは、胎生11日と同様に、類洞腔に出現したほか、肝細胞索内にも多数観察された。原始肝細胞索は造血細胞の分裂増殖により著しく拡大し、造血細胞は周囲を肝芽細胞によって囲まれる造血巣を形成した (Fig. 2b)。造血巣では赤血球系造血

細胞が大多数で、幼若な赤芽球から成熟赤芽球までの種々の成熟段階がみられた。径50 μm 以上の球状造血巣では肝芽細胞と接する周辺部に幼若赤芽球が分布し、赤芽球は造血巣の中心部へ向かって成熟し、好酸赤芽球となって脱核を開始した。肝芽細胞は赤芽球集団を取り囲んで著しく伸張し、細胞質突起で隣接する肝芽細胞と連結した。肝細胞索内において、周囲に赤芽球を密着させた F4/80陽性マクロファージは、造血巣のほぼ中央に位置し、赤芽球島形成が顕著であった。マクロファージは赤芽球間に長い

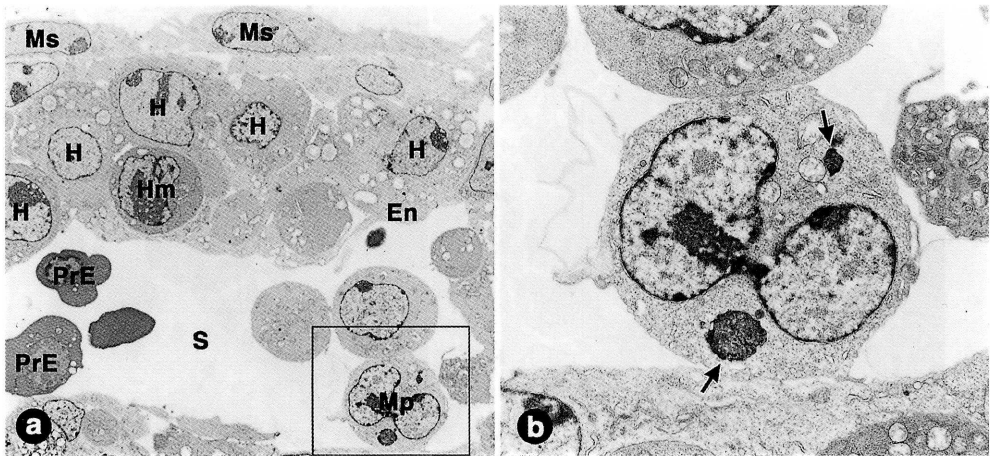


Fig. 4. Electron micrographs of an 11-day embryonic liver.

a. A primitive hepatic cord and sinusoid (S).

Hematopoietic cells (Hm) are scattered in small groups among hepatoblasts (H). En : endothelial cell. Mp : macrophage. Ms : mesothelial cell. PrE : primitive erythrocyte. $\times 1,150$.

b. A sinusoidal macrophage of the framed area in (a).

A few phagosomes can be observed (arrows) in the cytoplasm. $\times 3,500$.

細胞質突起を伸ばし、細胞質には径 $0.1\sim 3\mu\text{m}$ の封入体が $2\sim 4$ 個含まれ、なかでも球状封入体は鉄陽性反応を示すことが非常に多かった。この時期の肝細胞索内のすべてのF4/80陽性マクロファージは鉄反応陽性の封入体を少なくとも1個以上含有した (Fig. 3b)。赤芽球島中心マクロファージは、形態的に異なる2種類の封入体を有した。1つは肝芽細胞間で放出された赤芽球核由来する封入体で、核内の異染色質を電顕レベルで認めた。他は核を含まず、電子密度が非常に高く、核を含む封入体に比べると小型の封入体であった (Fig. 5a, b)。

C. 胎生19日 (肝臓造血退縮期—胎生期)

胎生19日の肝細胞索内で肝細胞の細胞質は増大し細胞輪郭は立方状となった。隣接する肝細胞同士は広く細胞側面で密接し、肝細胞の索状または板状の配列が次第に明瞭となった。肝細胞の細胞質には発達した粗面小胞体や多量のグリコーゲンが含まれた。造血巣は径 $20\sim 30\mu\text{m}$ と最盛期の約 $1/2$ 以下に縮小し、肝細胞間や肝細胞と類洞内皮細胞間に局限して島状孤立性に点在した。造血巣内には赤血球系に混じって顆粒球系造血細胞も含まれた。F4/80陽性マクロ

ファージは小型造血巣のほぼ中央に位置し、径 $0.1\sim 3\mu\text{m}$ の封入体を $2\sim 4$ 個含み、径 $0.1\sim 0.3\mu\text{m}$ の小型球状封入体の多くが鉄染色陽性反応を示した (Fig. 3c)。造血巣内でマクロファージは少数の造血系細胞に囲まれて存在したが、マクロファージと造血系細胞の間には約 $0.5\mu\text{m}$ の広い細胞間隙が認められた。マクロファージの細胞質は乏しくなるが、赤芽球からの放出核や電子密度が非常に高い封入体を多数含んだ (Fig. 5c)。胎生後期の肝臓にF4/80染色を行うと、造血巣内のマクロファージとは別に、小型の陽性細胞がごく少数認められた。小型F4/80陽性単核細胞は細胞輪郭が球状で凹凸が少なく、多数の細胞突起が特徴の造血巣マクロファージとは異なる形態を有した。

D. 生後4日 (肝臓造血退縮期—生後早期)

生後4日の肝臓内で造血細胞の数はさらに減少し (Fig. 2c)、F4/80染色した肝臓標本には多数の陽性単核細胞が含まれた。生後早期のF4/80陽性マクロファージは、鉄反応陽性と鉄反応陰性の2種類を明確に区別できた。鉄陽性マクロファージは胎生期における造血巣マクロファージと同様で、複雑な長い細胞質突起を有

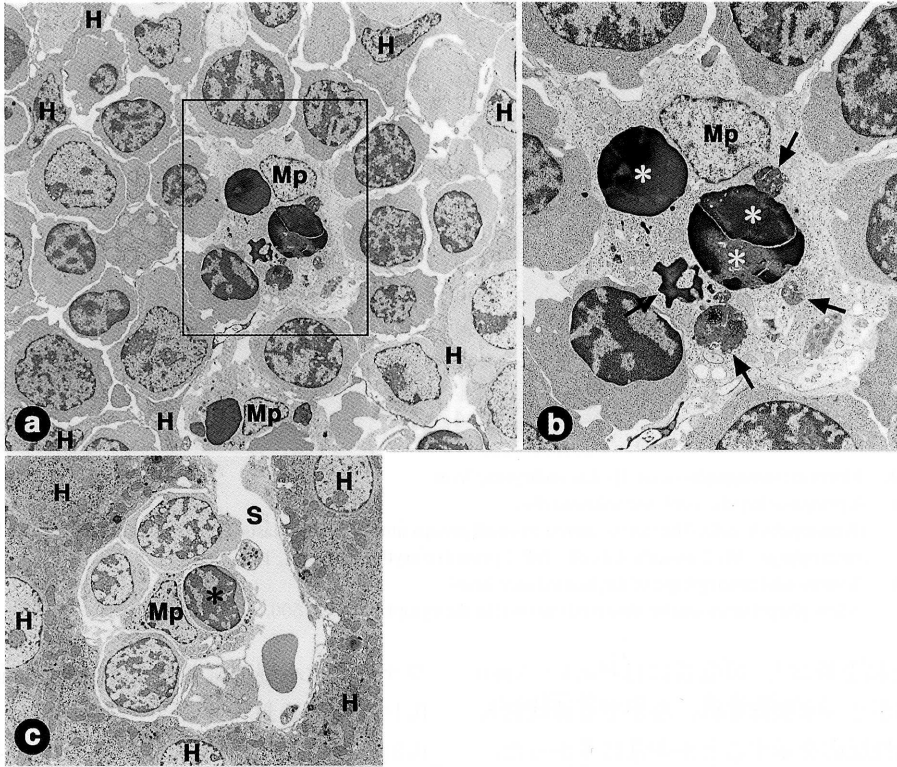


Fig. 5. Electron micrographs of fetal liver hematopoiesis.

a. Thirteen days of gestation.

A hematopoietic cell cluster is surrounded by hepatocytes (H), and a macrophage (Mp) is located in the center of the cell cluster as a central macrophage of an erythroblastic island. $\times 2,200$.

b. A central macrophage (Mp) of the framed area in (a).

The cytoplasm contains phagosomes derived from extruded nuclei of erythroblasts (*) and electron-dense inclusions (arrows). $\times 5,000$.

c. Nineteen days of gestation.

The size of the hematopoietic cell cluster is remarkably reduced. The cytoplasm of the central macrophage (Mp) is scanty but contains a large phagosome (*) derived from an extruded nucleus. H: hepatocyte. S: sinusoid. $\times 2,200$.

する長径 $10\ \mu\text{m}$ 以上の大型マクロファージで、径 $0.1\sim 0.3\ \mu\text{m}$ の鉄反応陽性の球状封入体を1個以上含有した (Fig. 3d). 鉄反応陽性大型マクロファージは造血細胞と隣接して肝細胞間に存在する場合もあるが、なかには造血細胞集団とは別に肝細胞間および類洞腔または類洞周囲腔に単独で観察されるものも存在した。大型マクロファージは電顕レベルで長径 $8\sim 14\ \mu\text{m}$ 、短径 $4\sim 6\ \mu\text{m}$ の不整形の細胞輪郭を呈し、細胞表面には長さ $1\sim 2\ \mu\text{m}$ の突起を多数有した。核は異染色質に乏しい径 $3\sim 7\ \mu\text{m}$ の不整形で、よく発達した核小体を核中央と核膜付近に1ま

たは2つ含有した。細胞質は径 $50\sim 100\ \text{nm}$ の球形または杆状のライソゾームの集合を含むことが多く、ミエリン様の膜構造や赤芽球放出核と電子密度の高い封入体を含むのが特徴であり、このほかに径 $100\ \text{nm}$ の多数の微飲小胞や大小様々なサイズの空胞が細胞膜直下に観察された。大型マクロファージの核-細胞質比はおよそ 0.4 であった (Fig. 6a)。

F4/80陽性で鉄反応に対し陰性を示した細胞として、大小の2型を区別できた。小型のF4/80陽性単核細胞は球形の細胞輪郭を呈し、大型の封入体は認められなかった (Fig. 3e)。小型

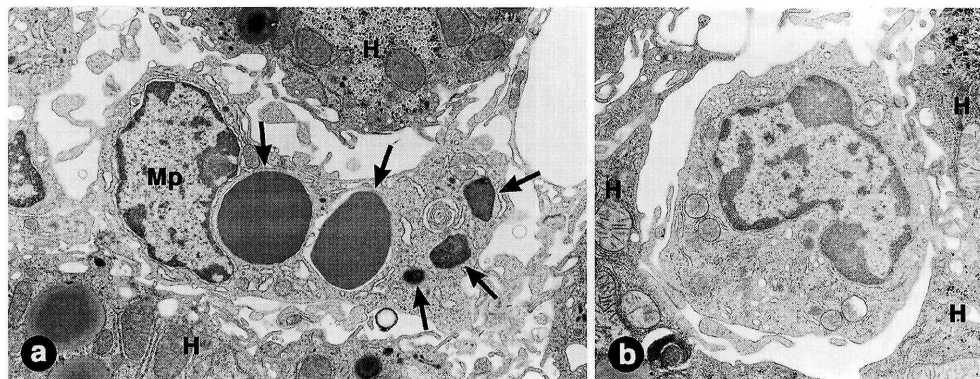


Fig. 6. Macrophage and mononuclear cell in four-day neonatal liver. $\times 5,000$.

- a. A large-sized macrophage (Mp) among hepatocytes (H).
The cytoplasm contains numerous phagosomes (arrows), but, no erythroids can be seen around the macrophage.
- b. A small-sized mononuclear cell among hepatocytes (H).
The nucleus is indented, and the cytoplasm contains a few primary lysosomes.

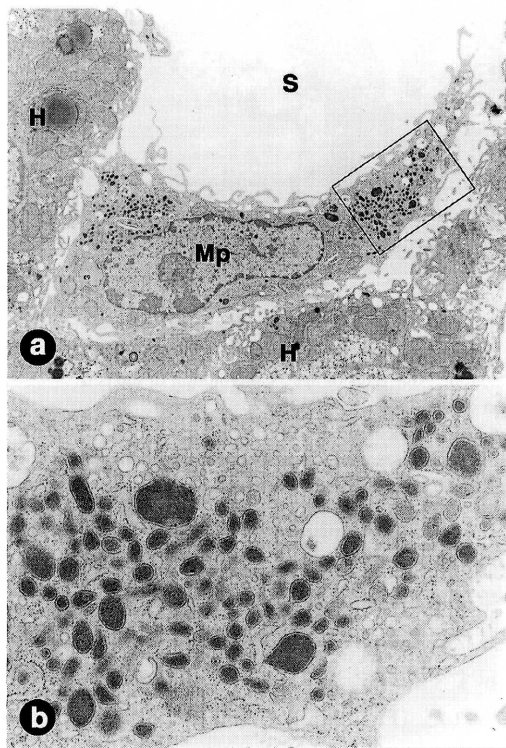


Fig. 7. A sinusoidal macrophage in liver at 13 days of age.

- a. The cytoplasm of a large-sized macrophage (Mp) contains abundant lysosomes, micropinocytotic vesicles, and vacuoles, and microvillous projections are prominent on the cell surface. H: hepatocyte. S: sinusoid. $\times 2,940$.
- b. A micrograph of the framed area in (a).
The cytoplasm contains many small-sized primary lysosomes. $\times 12,600$.

の F4/80 陽性単核細胞は電顕レベルで長径 5.5 ~ 7.5 μm , 短径 4.5 ~ 6.5 μm の球形または卵円形の細胞輪郭で, 細胞表面には長さ 0.5 μm の短い突起を少数有した. 核は核膜の陥入を伴う径 3 ~ 6.5 μm の不整形で, 発達した核小体を核膜付近に 1 つ有した. 細胞質には径 50 ~ 300 nm の球形または杆状のライソゾームが少数認められた. 小型単核細胞は核-細胞質比がおおよそ 1.1 の高値を示した (Fig. 6b). F4/80 陽性で鉄反応陰性の大型細胞は類洞腔内や類洞周囲腔に出現し, 生後早期には少ないが, 生後日齢とともに急速に増加し, 生後 7 ~ 13 日の肝臓では F4/80 陽性細胞のほとんどを占めた.

E. 生後13日 (肝臓造血終了期-生後早期)

生後13日の肝臓は, 中心静脈から放射状に広がる肝細胞索と類洞を含む小葉構造が明瞭となり, 造血細胞は肝細胞索内および類洞周囲腔にごく少数認められるのみであった (Fig. 2d). この時期の F4/80 陽性マクロファージは, ほとんどが複雑な細胞形態を有する長径 10 μm 以上の大型マクロファージであり, 類洞周囲腔または類洞腔に局限して認められた. 細胞質には径 1 μm 前後の封入体を 2 ~ 3 個含むことが多かったが, 鉄染色に対しては陰性であった (Fig. 3f). 封入体には細胞変性した好中球に由来す

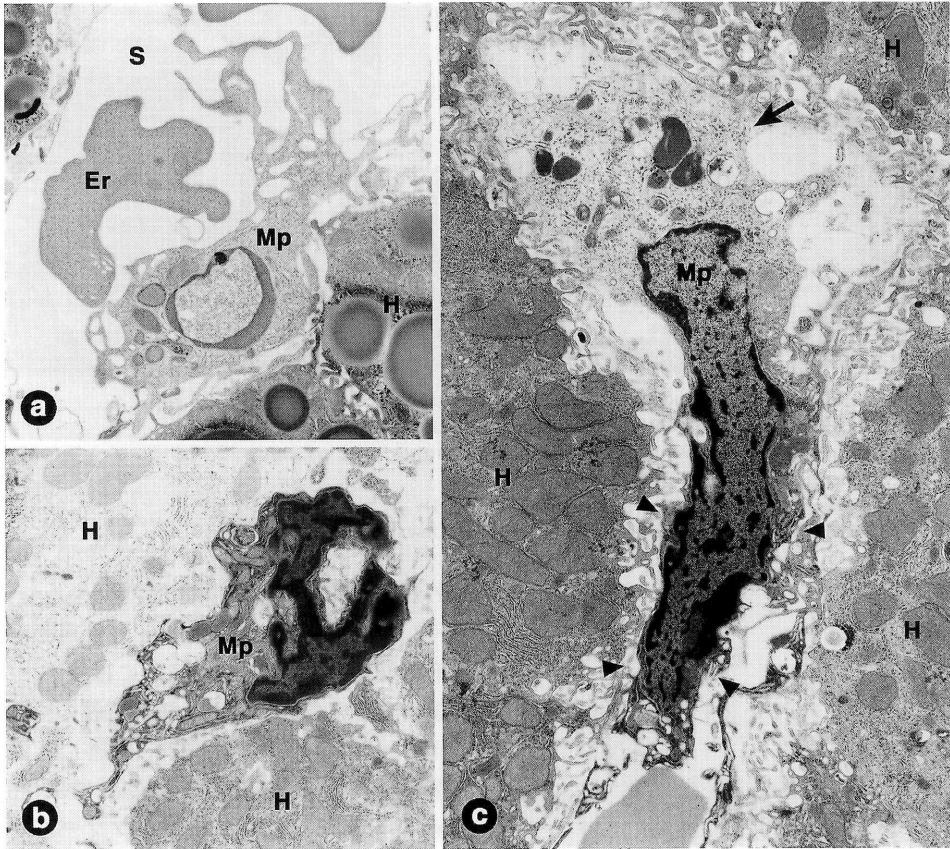


Fig. 8. Dying macrophages in neonatal livers.

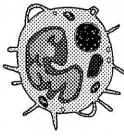
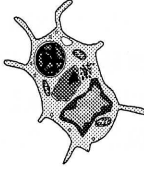


- a. An apoptotic macrophage (Mp) in the sinusoidal lumen (S). One day of age. The nucleus shows typical chromatin condensation and margination. Er : erythrocyte. H : hepatocyte. $\times 3,800$.
- b. A macrophage (Mp) at the late stage of dark cell formation. Nine days of age. Convolution of the cell and nuclear outline is evident, and nuclear deformation is prominent. $\times 5,200$.
- c. A macrophage at the early stage of dark cell formation. Nine days of age. An arrowed cytoplasmic part, containing several secondary lysosomes, appears intact, but both the nucleus and cytoplasm indicated by arrowheads are apparently dense and compacted. $\times 7,700$.

るものも認められた。類洞腔および類洞周囲腔のマクロファージは電顕レベルで長径7.5～16 μm 、短径3～6 μm の伸展した細胞輪郭を呈し、細胞表面には長さ0.5 μm 前後の突起を多数有した。核は細胞の片側に偏倚し、異染色質が核膜辺縁に凝集する径3～5 μm の不整形で、よく発達した核小体を核中央に1つ有した (Fig. 7a)。細胞質は径1 μm 前後の封入体や径50～100 nmの球形または杆状のライソゾームを多数含み (Fig. 7b)、このほかに微飲小胞や大小様々な空胞が細胞膜直下に多数観察された。

F. 肝臓マクロファージの細胞死

生後早期の類洞腔に染色質が内核膜に沿って半月状に凝集した核形態を呈し、細胞死の徴候を示すマクロファージがごく少数ではあるが認められた (Fig. 8a)。また肝細胞間または類洞腔に細胞形態が極度に変形萎縮し、核周部に強く凝集した異染色質をもつ核と原形質成分が非常に少なく、細胞小器官で占められた電子密度の非常に高い細胞質を有する孤立性の大型マクロファージが出現し (Fig. 8b)、なかには正常細胞質と電子密度の非常に高い変性細胞質および核部を併せ持つ大型マクロファージも認めら

Table 1. F4/80-positive cells in fetal and neonatal liver

	Fe-positive cells		Fe-negative cells	
	Primitive sinusoidal macrophages	Central macrophages of erythroblastic islands	Small mononuclear cells	Sinusoidal macrophages (Kupffer cells)
Time of appearance	from ten to eleven days of gestation	from twelve days of gestation to nine days after birth	from late gestation	from seven days after birth
Nucleus outline	deeply indented	irregularly ovoid	indented	irregularly ovoid
N/C ratio (Mean±SD)	0.7 ± 0.2	0.4 ± 0.1	1.1 ± 0.4	0.3 ± 0.1
Cell diameter				
long axis (Mean±SD)	10.2 ± 1.4 μm	11.5 ± 2.0 μm	6.6 ± 0.8 μm	13.2 ± 2.3 μm
short axis (Mean±SD)	8.5 ± 1.2 μm	5.3 ± 0.8 μm	5.3 ± 0.8 μm	4.8 ± 1.1 μm
Cytoplasm inclusions	phagosomes derived from primitive erythrocytes	phagosomes, derived from extruded nucleus and cytoplasm of erythroblasts, and myelin figures	none	phagosomes containing a few platelets
Fe-reaction	positive	strongly positive	negative	negative
Cell surface projection				
number	numerous	numerous	a few	numerous
length	1~3 μm	1~2 μm	0.5 μm	0.5~1 μm
				

れた (Fig. 8c). 生後10~12日以降の肝臓マクロファージは, 細胞質に鉄反応陰性の封入体を含みつつ, 類洞腔または類洞周囲腔に局限した。

考 察

マウス胚子で肝臓内に造血系細胞は胎生11日から集積をはじめ, 胎生13~14日で赤血球生成を中心として造血は最盛となり, 以後造血細胞は急速に減少する。胎生後期の肝臓造血巣には, 赤血球系のほかに顆粒球系造血細胞の比率が増加する。造血系細胞の減少は出生後も続き, 生後13日の肝臓に含まれる造血系細胞はきわめて少ない。F4/80抗体陽性を呈する単核細胞は肝臓形成直後の胎生11日からすでに肝臓内に少数認められ, 胎生後期を経て出生直後から生後早期までその数は増加する。F4/80陽性の単核細胞は, 細胞輪郭に一致して陽性反応が認められ, 赤芽球からの放出核をはじめとして赤血球生成と関連する大小の封入体を含有することが多く, 胎生期では肝臓内の造血巣に造血系細胞とともに造血巣内マクロファージとして認められる。

一方, 生後早期の肝臓におけるF4/80陽性マクロファージは, 必ずしも造血細胞と関連せず, 類洞腔や肝細胞間に単独で出現することが多く, 肝臓から造血細胞が消失する時には, 類洞腔マクロファージとして肝臓内に広く分布する。肝臓内マクロファージは含有する封入体, 肝細胞索内における局在ならびに造血系細胞との関連において, 肝臓造血の推移にともない胎生期から生後早期に著しい変化が認められる。

成績に述べたように胎生期から生後早期の肝臓にF4/80ならびに鉄染色を行うことにより, F4/80陽性細胞において鉄染色に対する反応によって陽性と陰性の2種類のマクロファージ系細胞が区別できる。すなわち鉄陽性封入体を有するマクロファージ系細胞には原始類洞腔マクロファージおよび赤芽球島中心マクロファージがあり, 一方, 鉄反応陰性を示すマクロファージ系細胞としては胎生後期から生後早期に肝細胞間に出現する小型球形の単核細胞と生後の類洞腔マクロファージを挙げることができる (Table 1)。両マクロファージ系細胞の肝臓内における分布・出現時期ならびにその運命には

大きな差違が存在する。

マウス胚子の肝臓は、造血器官として発生・発達し、マクロファージは肝臓造血の開始当初より卵黄囊由来の原始赤血球や肝細胞間で成熟した赤芽球からの放出核を活発に取り込んで、造血と密接に関わっている³⁾。造血期の肝臓内に存在するマクロファージは、肝臓造血の推移とともに機能的な分化を呈する。すなわち肝原基形成直後で、最も早く出現する原始類洞腔のマクロファージは、はじめ類洞内でスカベンジャーマクロファージとして原始赤血球の処理を専門とするが、その後肝細胞索内へ移動し、細胞分裂して増加しつつ、その周囲に赤芽球が集合して赤芽球島が形成されるようになる^{8),9)}。赤芽球島は古くから知られているように赤血球生成の形態学的な細胞単位であり¹⁰⁾、胎生13日から肝細胞索内に形成され、骨髄造血や脾臓造血がはじまる胎生後期から生後早期まで、マクロファージは周囲の造血系細胞とともに肝細胞間で造血巣を形成する¹¹⁾。赤血球系の造血においては、造血巣内で島中心マクロファージと赤芽球との間には特異的な細胞接着分子を介した連結が存在し、赤血球系造血細胞の増殖や分化の調節、また赤血球系細胞の細胞死を抑制する働きをもつといわれる^{12),13)}。また島中心マクロファージは古くから鉄を含む栄養源やサイトカインを周囲の赤芽球へ供給する一種の“Nurse cell”であり、赤血球生成時のヘモグロビン合成に必須な鉄の代謝経路にマクロファージが深く関与することが知られる^{14)~16)}。成績に述べたように、鉄染色陽性反応を示すのは、胎生期から生後早期において原始類洞腔マクロファージならびに赤芽球と密接する造血巣内の島中心マクロファージがほとんどである。鉄陽性封入体の存在は、マクロファージが赤血球系細胞と関連を有する証拠であり、肝臓における赤血球生成において“Nurse cell”として機能した形態学的な痕跡であると考えられ、島中心マクロファージの由来は卵黄囊の原始類洞腔マクロファージに求めることができよう。

ラット抗マウスマクロファージモノクローナ

ル抗体 F4/80は、マウスマクロファージ細胞膜に存在する分子量160 kDaの1本鎖糖タンパクを F4/80抗原として認識する¹⁷⁾。F4/80抗原は個体発生の早い段階から成体まで広くマウス組織内に出現するほぼすべてのマクロファージに認められ、単球などマクロファージの前駆細胞を含め、単核性食細胞系 (MPS) の単核細胞で発現することが知られている^{18)~21)}。成績で述べたように、F4/80抗体に対し、肝原基形成初期の原始類洞腔に出現するスカベンジャーマクロファージをはじめ、生後の肝臓内に出現するクッパー細胞も陽性反応を呈し¹⁹⁾、肝臓内におけるマクロファージの分化・成熟を観察する上で非常に有用な抗体である。マウス肝臓における F4/80陽性細胞は、胎生期において一様に増加し、出生直前にピークとなり、以降は減少して、成体では一定値を示すと報告されている²¹⁾。我々の観察においても、成績で述べたように、単位面積あたりの F4/80陽性細胞数は、肝臓形成期から生後早期まで急速に増加し、生後4日にピークとなる。肝臓の重量は引き続き増加するにも関わらず、F4/80陽性細胞数は生後4日と生後13日との間で有意に減少する。そしてこの時期に対応して、肝臓のマクロファージの一部には、細胞死にいたるものを認めることができる。すでに報告したように、光顕レベルの TUNEL 法で胎生後期から新生子期のマウス肝臓にプログラム細胞死を観察することができる²²⁾。TUNEL 反応に陽性を呈するのは、造血系細胞や肝細胞であり、これに加えて造血巣内のマクロファージもアポトーシスに陥る。成績で述べたように、マクロファージにみられる細胞死には核形態の変化が明瞭な古典的なアポトーシスの他に、核ならびに細胞質の高度な濃縮・萎縮を特徴とするいわゆる“dark cell formation”の像を呈するものが少なくない。“dark cell formation”はアポトーシスやネクローシスに加え、形態学的な視点から細胞死のカテゴリーの一つとして捉えられており、とくに腫瘍細胞死や神経細胞死と関連して出現すると報告されている^{23)~25)}。“dark cell formation”を呈するマクロ

ファージの細胞質に含まれる封入体やライソゾームから、造血系マクロファージとの関連が強く示唆される。新生子期は肝造血の退縮に伴って肝臓マクロファージにも著しい変化がみられる特異的な期間であり、肝造血を支えた胎生マクロファージの少なくとも一部は、新生子期にアポトーシスを含め、いくつかの異なる過程を経て細胞死に陥り、肝臓から消失すると考えられる。一方、この時期、鉄反応陰性のF4/80陽性小型単核細胞が肝臓内に新たに出現する。

生後の肝常在性マクロファージであるクッパー細胞は、生体内で最大の組織在住マクロファージ集団であり、血流によって運ばれる様々な物質をスカベンジャー細胞として活発に取り込み、分解処理する⁴⁾。また種々のサイトカインの産生、分泌に関与し、免疫機構の主要な細胞として機能することが知られている^{26)~29)}。クッパー細胞は不規則な細胞輪郭と不整形核を有し、細胞質はゴルジ装置や粗面小体を豊富に含み、特に酸フォスファターゼ陽性のライソゾームを多数持つのが特徴である^{30)~32)}。クッパー細胞の局在は肝小葉辺縁部に多くみられ、類洞内皮との間にICAM-1を介した接着を有しつつ類洞腔内に存在し、肝細胞索内には侵入しない^{33),34)}。クッパー細胞の起源については今日でもいくつかの仮説が存在する。骨髄の移植実験により、移植後肝臓内にドナー由来のクッパー細胞が出現すること³⁵⁾、細胞内のペルオキシダーゼ活性の局在パターンなどから^{36),37)}、クッパー細胞は単核性食細胞系に含まれ、骨髄造血に由来する単芽球から前単球を経て単球に分化し、肝臓へ遊出した後、生存期間数日~2週間程度の短命で分裂能をもたないクッパー細胞へ分化するという説^{5)~9)}がある一方で、クッパー細胞は分裂能を有し、最長6週前後の寿命を持つ長命の細胞であり、種々の条件下では細胞分裂を行うことにより自己再生する細胞集団であり³⁸⁾、strontium-89を用いた骨髄抑制実験により、単球生成を阻止した状態においても、クッパー細胞の数に減少がみられず、むしろ増加することなどから、骨髄の単核性食細胞系とは異なる細

胞系であろうという説もある^{39)~41)}。NaitoやTakahashiらは造血系の発達を視点として、卵黄囊造血期に出現した原始マクロファージが卵黄囊血管と胎児循環系の接続により、血行性に肝臓へ移動し、未熟な胎生マクロファージならびにその前駆細胞に分化した後、肝臓内で胎生マクロファージならびに前駆細胞が分裂、増殖し、肝常在マクロファージへと分化、生後のクッパー細胞へと分化するとしている^{20),21)}。いずれにせよ、肝臓大食細胞であるクッパー細胞の由来については、特に胎生マクロファージとの関連で不明な点が少なくない⁴²⁾。今回の観察を背景にクッパー細胞の由来を考えると、造血系中心マクロファージは鉄陽性の封入体を含むのに対し、生後早期の類洞腔内マクロファージすなわちクッパー細胞は鉄陰性であること、さらには肝臓造血が終息する胎生後期から生後早期にかけて、鉄陰性で幼若な形態を有する単核細胞が出現し、加えて大型マクロファージに細胞死を示す像が認められることを考え合わせると、胎生期造血系の赤芽球島中心マクロファージは肝臓造血の終焉とともにその役目を終え、替わって赤芽球島中心マクロファージとは由来の異なるF4/80陽性単核細胞が肝常在性マクロファージの前駆細胞として、肝臓に出現するようになるのであろう。新生子期におけるF4/80陽性細胞の減少は、肝内マクロファージが胎生マクロファージからクッパー細胞への移行期にみられる現象とみなすことができよう。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の御指導ならびに御鞭撻をいただきました川崎医科大学解剖学教室佐々木和信教授に深い感謝の意を表します。また技術的な側面で援助していただいた須田満寿美研究補助員をはじめとする解剖学教室員各位、川崎医科大学電子顕微鏡センターの上平賢三主任技術員ならびに須田泰司副主任技術員の援助に心から感謝いたします。本研究の一部は文部科学省科学研究費(No.14570031, 2002)と川崎医科大学プロジェクト研究費(13-201, 2001; 14-201, 2002)の援助によって行われた。

文 献

- 1) Medvinsky A, Dzierzak E : Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86 : 897-906, 1996
- 2) 佐々木和信 : 造血器官の発生 - 卵黄囊・AGM領域からの胚子肝臓へのシフトを中心として - . *生体の科学* 52 : 334-339, 2001
- 3) Sasaki K : Two forms of free mononuclear cells in sinusoids at the beginning of hepatic hemopoiesis of the mouse embryo : a qualitative and cytometrical study. *Acta Anat (Basel)* 139 : 97-103, 1990
- 4) Crofton RW, Diesselhoff-den Dulk MM, van Furth R : The origin, kinetics, and characteristics of the Kupffer cells in the normal steady state. *J Exp Med* 148 : 1-17, 1978
- 5) Van Furth R : Monocyte origin of Kupffer cells. *Blood Cells* 6 : 87-92, 1980
- 6) Van Furth R : Origin and turnover of monocytes and macrophages. *Curr Top Pathol* 79 : 125-150, 1989
- 7) Van Furth R : Production and migration of monocytes and kinetics of macrophages. *In Mononuclear Phagocytes : Biology of Monocytes and Macrophages*, ed by R.van Furth, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. 1992, pp 3-12
- 8) Sasaki K, Iwatsuki H, Suda M, Itano C : Scavenger macrophages and central macrophages of erythroblastic islands in liver hemopoiesis of the fetal and early postnatal mouse : a semithin light- and electron-microscopic study. *Acta Anat (Basel)* 147 : 75-82, 1993
- 9) Iwatsuki H, Sasaki K, Suda M, Itano C : Origin of the central cells of erythroblastic islands in fetal mouse liver : ultrahistochemical studies of membrane-bound glycoconjugates. *Histochem Cell Biol* 107 : 459-468, 1997
- 10) Bessis MC : Erythroblastic Islet. *In Living Blood Cells and their Ultrastructure*, New York, Springer-Verlag, 1973, pp 85-89
- 11) Sasaki K, Sonoda Y : Histometrical and three-dimensional analyses of liver hematopoiesis in the mouse embryo. *Arch Histol Cytol* 63 : 137-146, 2000
- 12) Sadahira Y, Mori M : Role of the macrophage in erythropoiesis. *Pathol Int* 49 : 841-848, 1999
- 13) Hanspal M, Smockova Y, Uong Q : Molecular identification and functional characterization of a novel protein that mediates the attachment of erythroblasts to macrophages. *Blood* 92 : 2940-2950, 1998
- 14) Bessis MC, Breton-Gorius J : Iron metabolism in the bone marrow as seen by electron microscopy : a critical review. *Blood* 19 : 635-663, 1962
- 15) Marton PF : Ultrastructural study of erythrophagocytosis in the rat bone marrow : I. Red cell engulfment by reticulum cells. *Scand J Haematol Suppl* 23 : 1-26, 1975
- 16) Rama R, Sanchez J, Octave JN : Iron mobilization from cultured rat bone marrow macrophages. *Biochim Biophys Acta* 968 : 51-58, 1988
- 17) Austyn JM, Gordon S : F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol* 11 : 805-815, 1981
- 18) Lee SH, Starkey PM, Gordon S : Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues : Immunochemical studies with monoclonal antibody F4/80. *J Exp Med* 161 : 475-89, 1985
- 19) Gordon S, Crocker PR, Morris L, Lee SH, Perry VH, Hume DA : Localization and function of tissue macrophages. *Ciba Found Symp* 118 : 54-67, 1986
- 20) Takahashi K, Yamamura F, Naito M : Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac : a light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study. *J Leukoc Biol* 5 : 87-96, 1989
- 21) Naito M, Hasegawa G, Takahashi K : Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. *Microsc Res Tech* 39 : 350-364, 1997
- 22) Sasaki K, Sonoda Y, Kumano I, Suda M : Types of programmed cell death : two variants expressed by neonatal murine

- hepatocytes. *Cells Tissues Organs* 175 : 34–42, 2003
- 23) Harmon BV : An ultrastructural study of spontaneous cell death in a mouse mastocytoma with particular reference to dark cells. *J Pathol* 153 : 345–355, 1987
 - 24) Walker NI, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JF : Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol* 13 : 18–54, 1988
 - 25) Csordas A, Mazlo M, Gallyas F : Recovery versus death of “dark” (compacted) neurons in non-impaired parenchymal environment : light and electron microscopic observations. *Acta Neuropathol (Berl)* 106 : 37–49, 2003
 - 26) Rosenthal AS : Regulation of the immune response role of the macrophage. *N Engl J Med* 303 : 1153–1156, 1980
 - 27) Nathan CF : Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 79 : 319–326, 1987
 - 28) Bouwens L : Structural and functional aspects of Kupffer cells. *Revis Biol Celular* 16 : 69–94, 1988
 - 29) Malik R, Selden C, Hodgson H : The role of non-parenchymal cells in liver growth. *Semin Cell Dev Biol* 13 : 425–431, 2002
 - 30) Wisse E : Observations on the fine structure and peroxidase cytochemistry of normal rat liver Kupffer cells. *J Ultrastruct Res* 46 : 393–426, 1974
 - 31) Wisse E : Kupffer cell reactions in rat liver under various conditions as observed in the electron microscope. *J Ultrastruct Res* 46 : 499–520, 1974
 - 32) McCuskey RS, McCuskey PA : Fine structure and function of Kupffer cells. *J Electron Microsc Tech* 14 : 237–246, 1990
 - 33) Wake K, Decker K, Kirn A, Knook DL, McCuskey RS, Bouwens L, Wisse E : Cell biology and kinetics of Kupffer cells in the liver. *Int Rev Cytol* 118 : 173–229, 1989
 - 34) Steinhoff G : Cells of the hepatic sinusoid volume 4. Leiden, The Kupffer Cell Foundation. 1993, pp 333–337
 - 35) Gale RP, Sparkes RS, Golde DW : Bone marrow origin of hepatic macrophages (Kupffer cells) in humans. *Science* 201 : 937–938, 1978
 - 36) Beelen RH, Broekhuis-Fluitsma DM, Korn C, Hoefsmit CM : Identification of exudate-resident macrophages on the basis of peroxidatic activity. *J Reticuloendothel Soc* 23 : 103–110, 1978
 - 37) Deimann W, Fahimi HD : The appearance of transition forms between monocytes and Kupffer cells in the liver of rats treated with glucan : A cytochemical and ultrastructural study. *J Exp Med* 149 : 883–897, 1979
 - 38) Miyakawa K, Myint YY, Takahashi K : Effects of recombinant human macrophage colony-stimulating factor on proliferation, differentiation and survival of Kupffer cells in the liver of adult mice. *Anal Quant Cytol Histol* 21 : 329–335, 1999
 - 39) Wisse E : Kupffer cell reactions in rat liver under various conditions as observed in the electron microscope. *J Ultrastruct Res* 46 : 499–520, 1974
 - 40) Widmann JJ, Fahimi HD : Proliferation of mononuclear phagocytes (Kupffer cells) and endothelial cells in regenerating rat liver : A light and electron microscopic cytochemical study. *Am J Pathol* 80 : 349–366, 1975
 - 41) Yamada M, Naito M, Takahashi K : Kupffer cell proliferation and glucan-induced granuloma formation in mice depleted of blood monocytes by strontium-89. *J Leukoc Biol* 47 : 195–205, 1990
 - 42) Anastassova-Kristeva M : The origin and development of the immune system with a view to stem cell therapy. *J Hematother Stem Cell Res* 12 : 137–154, 2003